

Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về định lượng *Enterobacteriaceae* không qua quá trình phục hồi – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc và kỹ thuật MPN

*Microbiology – General guidance for the enumeration of Enterobacteriaceae
without resuscitation – MPN technique and colony-count technique*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn chung để định lượng *Enterobacteriaceae* có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi:

- bằng cách tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi ủ ấm ở 35°C hoặc 37°C trong môi trường lỏng hoặc
- bằng cách đếm số khuẩn lạc trong môi trường đặc sau khi ủ ấm ở 35°C hoặc 37°C.

Nhiệt độ sử dụng cần được thoả thuận giữa các bên có liên quan và phải được ghi vào báo cáo thử nghiệm.

Chú thích 1 – Đối với thực phẩm đông lạnh, nhiệt độ nuôi ở 30°C là thích hợp khi mục đích đếm mang tính chất công nghệ.

Với số lượng nhỏ vi khuẩn, phương pháp MPN là thích hợp, trong các trường hợp khác phương pháp đếm khuẩn lạc thường được sử dụng hơn.

Tiêu chuẩn này không bao gồm các quy trình phục hồi, do đó kết quả không cần phải liên hệ đến các yêu cầu hoặc các đặc tính kỹ thuật dựa trên giả định là quá trình phục hồi đã được thực hiện.

Điểm hạn chế khi áp dụng tiêu chuẩn này là ở chỗ kết quả có độ dao động lớn. Vì vậy, phương pháp này chỉ nên sử dụng và giải thích kết quả theo thông tin nêu trong 10.3.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4881:1989 (ISO 6887 : 1983), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật.

TCVN 6847 : 2001

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1997), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các định nghĩa sau đây:

3.1 *Enterobacteriaceae* (Enterobacteriaceae): là các vi sinh vật lên men glucoza và cho phản ứng oxidaza âm tính khi tiến hành phép thử theo phương pháp qui định này.

3.2 Số đếm *Enterobacteriaceae* (count of Enterobacteriaceae): là số Enterobacteriaceae tìm thấy trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử khi tiến hành thử theo phương pháp qui định.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị dịch pha loãng

Chuẩn bị các dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử.

4.2 Định lượng *Enterobacteriaceae*

4.2.1 Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)

Chú thích 2 – Kỹ thuật này nên dùng khi số lượng *Enterobacteriaceae* được dự kiến trong khoảng từ 1 đến 100 trên mililit hoặc trên gam mẫu thử.

Cấy vào ba ống nghiệm môi trường nồng độ kép một lượng mẫu thử qui định nếu đó là sản phẩm lỏng hoặc một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Cấy vào ba ống nghiệm môi trường nồng độ đơn một lượng mẫu thử qui định nếu là sản phẩm lỏng hoặc với một lượng huyền phù ban đầu qui định nếu các sản phẩm ở dạng khác. Sau đó trong cùng một điều kiện, cấy ba ống môi trường nồng độ đơn với dịch pha loãng thập phân thứ nhất từ mẫu thử hoặc từ huyền phù ban đầu.

Ủ ấm các ống ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h.

Từ các ống được thử khẳng định dương tính, tính số có xác suất lớn nhất của *Enterobacteriaceae* trên mililit hoặc trên gam mẫu thử bằng cách tra bảng MPN (xem phụ lục A).

4.2.2 Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Chú thích 3 – Nên dùng kỹ thuật này khi số lượng *Enterobacteriaceae* được dự kiến lớn hơn 100 trên mililit hoặc trên gam mẫu thử.

Cấy vào thạch glucoza mật đỏ tím (violet red bile) chứa trong hai đĩa Petri (kỹ thuật đổ đĩa) một lượng mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng hoặc với một lượng huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác. Phủ lên bề mặt thạch đã cấy một lớp môi trường cùng loại.

Chuẩn bị các cặp đĩa khác trong cùng điều kiện thử và cấy các dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử hoặc từ huyền phù ban đầu.

Ủ ấm các đĩa ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h ± 2 h.

Từ số các khuẩn lạc điển hình đã được thử khẳng định trên mỗi đĩa, tính toán số *Enterobacteriaceae* có trên mililit hoặc trên gam mẫu thử.

5 Dịch pha loãng, các môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Khái quát

Thực hành phòng thí nghiệm, xem TCVN 6404:1998 (ISO 7218).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 4881 : 1989 (ISO 6887 : 1983) và tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm được xét nghiệm.

5.3 Môi trường nuôi cấy

5.3.1 Canh thang mật lỵc sáng có đẹm (canh thang E.E).

5.3.1.1 Thành phần

	a)	b)
	Môi trường nồng độ kép	Môi trường nồng độ đơn
Pepton	20,0 g	10,0 g
Glucosa	10,0 g	5,0 g
Dinatri hydro phosphat (Na ₂ HPO ₄)	12,90 g	6,45 g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	4,0 g	2,0 g
Mật bò khô (Ox bile dehydrated)	40,0 g	20,0 g
Lỵc sáng (brilliant green)	0,030 g	0,015 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Không đun nóng môi trường quá 30 phút. Làm nguội nhanh môi trường.

Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi là 7,2 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển thành các phần 10 ml vào mỗi ống nghiệm hoặc chai vô trùng (6.8).

TCVN 6847 : 2001

Không hấp môi trường bằng nồi hấp áp lực.

Môi trường này có thể bảo quản một tuần ở 0°C đến 5°C.

5.3.2 Thạch glucoza mật đỏ tím (Violet red bile glucose agar) (VRBG)

5.3.2.1 Thành phần

Pepton	7,0 g
Cao men	3,0 g
Muối mật (bile salts)	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể (crystal violet)	0,002 g
Thạch ở dạng bột hoặc ở dạng vẩy	8 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

1) Phụ thuộc sức đông của thạch

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Không đun nóng môi trường quá 30 phút.

Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi là 7,4 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển môi trường nuôi cấy này vào các ống nghiệm, bình hoặc lọ vô trùng (6.8) có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Không hấp môi trường bằng nồi hấp áp lực

Chuẩn bị môi trường này ngay trước khi sử dụng (xem 9.2.2 và 9.3.1).

5.3.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch (chỉ yêu cầu đối với kỹ thuật MPN, xem 9.2.2)

Chuyển ngay khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy đã được làm nguội đến khoảng 45°C vào các đĩa Petri (6.6) và để cho đông lại.

Ngay trước khi sử dụng, sấy các đĩa, và tốt nhất là mở nắp để rời và để bề mặt thạch úp xuống trong tủ sấy (6.3) cho đến khi bề mặt của thạch khô hết nước bám.

Nếu chuẩn bị trước, các đĩa chưa khô này không nên giữ quá 4 h ở nhiệt độ phòng hoặc 1 ngày ở 0°C đến 5°C.

5.3.3 Thạch glucoza**5.3.3.1 Thành phần**

Trypton	10,0 g
Cao men	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Bromcresol tía	0,015 g
Thạch ở dạng bột hoặc vẩy	8 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml
1) Phụ thuộc sức đông của thạch	

5.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng là 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Chuyển từng lượng 15 ml môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm hoặc các bình (6.8).

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 phút ở 121°C.

Để các ống nghiệm hoặc các bình ở vị trí đứng.

Môi trường này có thể bảo quản đến một tuần ở 0°C đến 5°C.

Ngay trước khi sử dụng, hâm nóng ở trong nước sôi hoặc ở trong nồi hơi nước nóng trong 15 phút, sau đó nhanh chóng làm nguội đến nhiệt độ ủ ấm.

5.3.4 Thạch dinh dưỡng**5.3.4.1 Thành phần**

Chất chiết cao thịt bò	3,0 g
Pepton	5,0 g
Thạch ở dạng bột hoặc vẩy	8 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml
1) Phụ thuộc sức đông của thạch	

5.3.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng là 7,0 ở 25°C, nếu cần.

TCVN 6847 : 2001

Chuyển môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm, chai hoặc bình (6.8) có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

5.3.4.3 Chuẩn bị các đĩa thạch (xem 9.4.1)

Chuyển ngay khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy đã được làm tan chảy và làm nguội đến khoảng 45°C vào các đĩa Petri (6.6) và để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, sấy khô các đĩa, và tốt nhất là cùng với nắp để mở và để bề mặt thạch hướng xuống dưới ở trong tủ sấy (6.3) cho đến khi bề mặt thạch khô.

Nếu chuẩn bị trước, các đĩa chưa khô này không được giữ lâu quá 4 h ở nhiệt độ phòng hoặc 1 ngày ở 0°C đến 5°C .

5.4 Thuốc thử oxidaza

5.4.1 Thành phần

N,N,N,N' -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylen diamin dihydro clorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử trong nước lạnh.

Chuẩn bị thuốc thử ngay trước khi sử dụng.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Chú thích 4 – Có thể dùng các thiết bị, dụng cụ sử dụng một lần thay cho việc dùng lại các dụng cụ thuỷ tinh nếu chúng đáp ứng được các yêu cầu qui định.

Trang thiết bị phòng thí nghiệm phân tích vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1 Thiết bị để thanh trùng khô (tủ sấy) hoặc để thanh trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404:1998 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.3 Buồng sấy hoặc tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.4 pH met, có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

6.5 Nồi cách thuỷ, hoặc thiết bị tương tự, có khả năng hoạt động ở $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.6 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.7 Vòng que cấy, bằng platin/iridi hoặc niken/crom đường kính khoảng 3 mm và dây cùng một loại vật liệu hoặc đĩa thủy tinh.

Chú thích 5 – Vòng que cấy niken/ crom không thích hợp cho phép thử oxidaza (xem 9.4.2.1).

6.8 Ống nghiệm, có kích thước khoảng 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm, và các bình hoặc chai có dung tích từ 150 ml đến 500 ml.

6.9 Pipet chia độ xả hết, có dung tích danh định từ 1 ml đến 10 ml được chia độ tương ứng 0,1 ml và 0,5 ml.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thí nghiệm nhận được mẫu đại diện trung thực và không bị hư hỏng hay biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Phương pháp lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến việc lấy mẫu sản phẩm thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với từng sản phẩm. Nếu không có các tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và dịch pha loãng

Xem TCVN 4881 : 1989 (ISO 6887 : 1983) và tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm.

Từ mẫu thử nếu sản phẩm là lỏng hoặc là từ huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác chuẩn bị một loạt dịch pha loãng đơn thập phân.

9.2 Kỹ thuật MPN

9.2.1 Cấy và ủ ấm

Lấy ba ống môi trường nồng độ kép [5.3.1.1 a)]. Dùng Pipet (6.9) cho vào mỗi ống 10 ml mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 10 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác vào từng ống nghiệm.

Lấy ba ống môi trường nồng độ đơn [5.3.1.1 b)]. Dùng Pipet khác (6.9) chuyển 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác vào từng ống nghiệm.

TCVN 6847 : 2001

Lấy ba ống môi trường đơn [5.3.1.1 b)] nữa. Dùng Pipet khác (6.9) chuyển vào mỗi ống 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) của mẫu thử nếu sản phẩm là lỏng hoặc 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất từ huyền phù ban đầu (10^{-2}) nếu các sản phẩm ở dạng khác vào từng ống nghiệm.

Ủ ấm 9 ống này ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h.

9.2.2 Phân lập

Dùng vòng que cấy (6.7) ria tất cả 9 môi trường nuôi cấy (9.2.1) lên đĩa thạch glucoza mật đỏ tím (xem 5.3.2.3) và ủ các đĩa này ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h.

9.2.3 Chọn các khuẩn lạc để thử kháng định

Từ mỗi đĩa đã được ủ ấm theo 9.2.2 mà trên đó có các khuẩn lạc có màu hồng đến màu đỏ điển hình (có hoặc không có quang tử) hoặc không màu, các khuẩn lạc này đã phát triển, chọn một cách ngẫu nhiên 5 khuẩn lạc như vậy để thử kháng định sinh hoá (xem 9.4.2) sau khi cấy truyền (xem 9.4.1).

9.3 Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

9.3.1 Cấy và ủ ấm

9.3.1.1 Lấy hai đĩa petri vô trùng (6.6). Dùng pipet vô trùng (6.9) chuyển vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lấy hai đĩa petri vô trùng khác, dùng một pipet mới vô trùng chuyển vào mỗi đĩa 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 1 ml dịch pha loãng thập phân đầu tiên của huyền phù ban đầu (10^{-2}) nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lặp lại trình tự trên với các độ pha loãng tiếp theo và dùng pipet mới vô trùng cho mỗi dịch pha loãng mới.

9.3.1.2 Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường VRBG (5.3.2) đã được chuẩn bị và làm nguội đến khoảng 45°C trong nổi cách thuỷ (6.5). Thời gian tính từ khi chuẩn bị xong huyền phù ban đầu (hoặc dịch pha loãng 10^{-1} nếu sản phẩm là chất lỏng) và lúc môi trường (5.3.2) được rót vào các đĩa không vượt quá 15 phút.

Trộn cẩn thận chất nuôi cấy vào môi trường bằng cách lắc ngang và để cho hỗn hợp đông đặc lại. Đặt các đĩa Petri ở vị trí nằm ngang, ở chỗ mát.

9.3.1.3 Sau khi hỗn hợp đông đặc hoàn toàn, phủ lên bề mặt 10 ml đến 15 ml môi trường VRBG (5.3.2) đã được chuẩn bị và làm nguội như mô tả ở 9.3.1.2 để tránh vi khuẩn mọc lan và có được điều kiện bán yếm khí. Lại để cho đông đặc như mô tả ở trên.

9.3.1.4 Lật ngược các đĩa đã cấy mẫu và ủ ấm ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h.

9.3.2 Đếm và chọn các khuẩn lạc

Chọn các đĩa (9.3.1.4) có chứa ít hơn 150 khuẩn lạc điển hình (xem 9.2.3) có đường kính 0,5 mm hoặc lớn hơn; đến các khuẩn lạc nghi ngờ này. Chọn ngẫu nhiên 5 khuẩn lạc như vậy từ mỗi đĩa để thử khẳng định sinh hoá (xem 9.4.2) sau khi cấy truyền (xem 9.4.1).

Cần nhắc phép xác định để tránh nếu một nửa hoặc trên một nửa diện tích bề mặt của đĩa vi khuẩn mọc quá dày. Nếu ít hơn một nửa diện tích bề mặt của đĩa mọc quá dày, thì đếm các khuẩn lạc trên phần nhìn rõ và lấy tỷ lệ sao cho có được số lượng tương ứng với tổng diện tích bề mặt của đĩa.

9.4 Phép thử khẳng định

9.4.1 Cấy truyền

Ria lên các đĩa thạch dinh dưỡng (5.3.4) từng khuẩn lạc đã được chọn để thử khẳng định (xem 9.2.3 và 9.3.2).

Ủ các đĩa này ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Chọn khuẩn lạc được phân lập tốt từ các đĩa đã ủ ấm để thử khẳng định sinh hoá (xem 9.4.2).

9.4.2 Thử khẳng định sinh hoá

9.4.2.1 Phản ứng oxidaza

Dùng vòng que cấy hoặc dây bằng platin/iridi hoặc đũa thuỷ tinh (6.7), lấy một phần nhỏ từ mỗi khuẩn lạc được phân lập tốt (9.4.1) và ria lên giấy lọc đã được tẩm thuốc thử oxidaza (5.4) hoặc lên các đĩa bán sẵn. Không dùng que cấy niken/crom.

Phép thử được coi là âm tính khi màu của tấm giấy lọc đó không chuyển sang màu sẫm trong vòng 10 giây.

Cần theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với các đĩa chế tạo sẵn.

9.4.2.2 Thử lên men

Dùng dây (6.7) lấy sâu cùng một loại khuẩn lạc đã được chọn ở 9.4.1 cho vào các ống chứa thạch glucoza (5.3.3). Ủ ở 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Nếu màu vàng lan khắp ống thạch, phản ứng được coi là dương tính. Hầu hết các chủng *Enterobacteriaceae* đều sinh khí.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Tính số xác suất lớn nhất (MPN)

10.1.1 Đếm số ống cho phản ứng dương tính đối với mỗi độ pha loãng

TCVN 6847 : 2001

10.1.2 Nếu một trong những khuẩn lạc điển hình được chọn (9.2.3) từ đĩa cấy truyền (xem 9.4.1) có phản ứng oxidaza âm tính và glucoza dương tính, thì ống nghiệm chứa mẫu cấy truyền đó được coi là dương tính.

10.1.3 Từ số ống dương tính của các độ pha loãng khác nhau tra bảng MPN (xem phụ lục A) để xác định chỉ số xác suất lớn nhất (MPN).

10.1.4 Đối với các sản phẩm lỏng số *Enterobacteriaceae* trên mililit được tính bằng cách chia chỉ số MPN cho 10. Đối với các sản phẩm ở dạng khác mà từ đó huyền phù ban đầu được chuẩn bị thì lượng vi khuẩn trên gam sẽ bằng chỉ số MPN.

10.2 Tính toán số đếm khuẩn lạc

10.2.1 Khái quát

Nếu có ít nhất 80% các khuẩn lạc điển hình được chọn (xem 9.3.2) có phản ứng oxidaza âm tính và glucoza dương tính và như vậy được thử khẳng định là *Enterobacteriaceae*, thì số vi sinh vật sẽ bằng số đếm như ở 9.3.2.

Trong tất cả các trường hợp khác, số khuẩn lạc sẽ được tính từ phần trăm số khuẩn lạc oxidaza âm tính và glucoza dương tính trong tổng số các khuẩn lạc được chọn (xem 9.3.2).

Làm tròn kết quả số khuẩn lạc tính toán thành số nguyên.

10.2.2 Trường hợp chung

Tính số *Enterobacteriaceae*, N , trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm, dùng công thức sau:

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + n_2)d}$$

trong đó

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc đếm được sau khi nhận dạng ở tất cả các đĩa giữ lại;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa được giữ lại độ pha pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng ứng với dịch pha loãng thứ nhất. Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa.

Kết quả là số vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam sản phẩm, được biểu thị bằng một số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là số mũ của 10.

Thí dụ

Đếm trực tiếp số vi sinh vật cho kết quả sau:

- ở dịch pha loãng thứ nhất được giữ lại (10^{-3}): 66 và 80 khuẩn lạc;

- ở dịch pha loãng thứ hai (10^{-4}): 4 và 7 khuẩn lạc;

Các số sau đây được xem xét:

- Đối với 66 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, 4 trong số này phù hợp với tiêu chuẩn và cho $a = 50$.
- Đối với 80 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, 3 trong số này phù hợp với tiêu chuẩn và cho kết quả $a = 48$.
- Đối với 7 khuẩn lạc: 5 khuẩn lạc, 4 trong số này phù hợp với tiêu chuẩn và cho kết quả $a = 6$.
- Đối với 4 khuẩn lạc: tất cả 4 được tìm thấy cũng là số vi sinh vật cần tìm.

Do đó

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

$$= \frac{66 + 48 + 6 + 4}{(2 + 0,2) \times 10^{-3}}$$

$$= \frac{124}{2,2 \times 10^{-3}} = 56\,363$$

Làm tròn kết quả theo qui định ở trên và kết quả là 56 000 hoặc $5,6 \times 10^4$ *Enterobacteriaceae* trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.2.3 Ước đoán số lượng nhỏ

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) chứa ít hơn 15 khuẩn lạc thì tính số trung bình số học m từ các khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa

Báo cáo kết quả như sau:

- Số ước đoán *Enterobacteriaceae*, N_E , trên mililit:

$$N_E = m \text{ (sản phẩm lỏng)}$$

- Số ước đoán *Enterobacteriaceae*, N_E , trên gam:

$$N_E = m \times d^{-1} \text{ (các sản phẩm ở dạng khác), trong đó } d \text{ là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.}$$

10.2.4 Trường hợp không có khuẩn lạc đặc trưng

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) không có các khuẩn lạc đặc trưng, báo cáo kết quả như sau:

- Nhỏ hơn 1 vi sinh vật trên mililit (sản phẩm lỏng);
- Nhỏ hơn $1 \times d^{-1}$ vi sinh vật trên gam (các sản phẩm ở dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.3 Độ chụm

10.3.1 Kỹ thuật MPN

Thực tế cho thấy, kỹ thuật MPN có kết quả dao động rất lớn. Vì vậy sử dụng kết quả theo phương pháp này phải hết sức cẩn thận. Giới hạn tin cậy được cho ở phụ lục A.

10.3.2 Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Tính riêng về mặt thống kê trong 95% trường hợp, giới hạn tin cậy của kỹ thuật đếm khuẩn lạc dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$ ¹⁾, đối với số đếm khuẩn lạc ít hơn 15 trên đĩa, giới hạn tin cậy cho ở phụ lục B. Trên thực tế, sai lệch này thậm chí còn lớn hơn, đặc biệt giữa các kết quả nhận được từ các nhân viên thí nghiệm khác nhau.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần nêu rõ phương pháp đã sử dụng, nhiệt độ ủ ấm và kết quả nhận được. Báo cáo thử nghiệm cũng cần phải đề cập đến bất kỳ các thao tác nào mà không được qui định trong tiêu chuẩn này cũng như các điều được coi là tùy ý và các sự cố có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

¹⁾ See Cowell N. D. and Morisetti M.D., J.Sci. Fd. Agric., 20, 1969, p.573.

Phụ lục A

(Qui định)

Xác định số có xác suất lớn nhất

Xem bảng A.1 và bảng A.2.

Bảng A.1 – Chỉ số MPN và giới hạn tin cậy

Số kết quả dương tính			Chỉ số ¹⁾ MPN	Cấp hạng ²⁾ khi số mẫu được thử					Giới hạn tin cậy ¹⁾³⁾			
				1	2	3	5	10	≥ 95%		≥ 99%	
0	0	0	<0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2

Bảng A.1 (Tiếp theo)

3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

1) From De Man, J.C., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 1983, pp. 301 - 305.

2) Xem bảng A.2.

3) Giới hạn tin cậy cho trong bảng này chỉ là giá trị trung bình nhằm cung cấp một số ý tưởng về ảnh hưởng của sai lệch thống kê đối với các kết quả, ngoài ra còn có những nguồn sai lệch khác mà đôi khi còn quan trọng hơn.

Bảng A.2 – Các cấp hạng

Cấp hạng	Định nghĩa
1	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu bằng số MPN được tìm thấy, thì kết quả nằm trong số có khả năng cao nhất thu được. Hầu như chỉ có 5% khả năng nhận được kết quả nhỏ hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.</p>
2	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số khả năng thu được ít hơn cả số có khả năng xảy ra nhỏ nhất trong cấp hạng 1, nhưng tối đa chỉ có 1% khả năng thu được một kết quả có thể thấp hơn kết quả nhỏ nhất có thể xảy ra ở cấp hạng này.</p>
3	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 2, nhưng tối đa chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả có thể thấp hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.</p>
0	<p>Khi số lượng vi khuẩn trong mẫu thử bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 3, chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả ở cấp hạng này, nếu như không có một sai sót nào</p>
<p>1) Trước khi bắt đầu thử cần phải quyết định chọn cấp hạng nào tức là chỉ có cấp hạng 1, 1 và 2 hoặc thậm chí 1, 2 và 3. Việc quyết định cơ sở để chọn kết quả là rất quan trọng, chỉ kết quả cấp hạng 1 hoặc hầu hết cấp hạng 1 và 2 được chọn. Kết quả cấp hạng 0 được coi là đáng nghi ngờ nhất.</p>	

Phụ lục B

(Qui định)

Giới hạn tin cậy đối với ước đoán số lượng nhỏ khuẩn lạc

Giới hạn tin cậy ở mức 95 % đối với ước đoán khi số khuẩn lạc được giữ lại nhỏ hơn 15 được cho ở bảng B.1

Bảng B.1

Số lượng vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở mức 95%	
	Thấp hơn	Cao hơn
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23